

論文内容の要旨

味蕾細胞の分化と機能に関する時間的解析 (Temporal analysis of differentiation and functions of the taste bud cells)

濱道 良子

味覚は動物にとって重要な外部感覚の一つであり、脊椎動物では味蕾という特殊な組織で味物質を受容している。哺乳類の味蕾は口腔内の舌乳頭や口蓋に分布していて、一つの味蕾は形態・機能・細胞齢の点で分類される 50–100 個程度の味蕾細胞から構成されている。紡錘形の細胞でグリアのような役割をしていると考えられている細胞(Type I 細胞)、甘味・旨味・苦味の味物質を受容し味覚のシグナル伝達をする味覚受容細胞(Type II 細胞)、味神経とシナプスを形成しているシナプス形成細胞(Type III 細胞)、そして味蕾内の基底部付近にある丸い形の基底細胞(Type IV 細胞)である。また、成体においても、古い味蕾細胞が新しい細胞へと置き換わりターンオーバーすることによって、味蕾は恒常性を保っている。すなわち、味蕾内には細胞分裂直後の細胞、分化段階にある細胞、成熟し機能している細胞、細胞死直前の細胞など、様々な細胞齢の細胞が混在している。しかし、味蕾細胞は他の上皮細胞や神経細胞のように組織における細胞の位置から機能や細胞齢を推測することが難しいため、これまで味蕾細胞の細胞齢を詳細に解析した研究は少なかった。例えば、味蕾細胞は約 10 日の寿命であると考えられていたが、細胞の機能により寿命が異なることはないのか、分化にはどれ程の時間が必要なのかなど、これまでターンオーバーに関する詳細は明らかになっていなかった。そこで私は味蕾細胞を細胞齢の視点で解析する実験方法を確立し、味蕾細胞の寿命を詳細に解析した。また、味覚受容細胞がいつどのように形成さ

れ機能するのかを明らかにするため、まず分化段階や味覚機能に関係すると予想された転写因子について味蕾における発現を検討した。さらに、味蕾細胞に発現する因子の経時的な解析を行い、味蕾細胞の分化や機能発現について考察した。

1. 味蕾細胞の寿命について

まず、味蕾細胞の細胞齢を明らかにするために 5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)によって分裂細胞を標識する実験系を確立して、味蕾細胞の時間的解析系を構築した。BrdU は DNA 複製時にチミジンに代わって DNA 中に取り込まれるため、分裂細胞を標識することができ、その後、細胞が細胞分裂をしたり移動したりしても、BrdU 含有量が検出限界以下になるまで追跡することができる。味蕾やその周辺組織における BrdU 標識条件を検討した結果、BrdU を 50 mg/kg (ラット体重)で 21 時に腹腔注射して投与するのが最適な標識条件であることが分かった。

次に、BrdU 投与直後から約 1 ヶ月間の味蕾で観察される BrdU 標識細胞の量的変化を、位置情報と合わせて経時的に解析して、味蕾細胞の誕生からの細胞移動や寿命を詳細に解析した。その結果、味蕾周辺上皮の基底部に存在する細胞が分裂し、それにより生まれた細胞の中のごく一部が味蕾へと進入して味蕾細胞となり、その後、上方へ移動していることが分かった。また、進入した味蕾細胞のうちの約半数は 2 日以内に失われるが、約 1/4 の細胞は一ヶ月後にも観察されたので、味蕾細胞は寿命が大きく異なる二つの細胞集団に分けられることがわかった。すなわち、従来は味蕾細胞の寿命は平均約 10 日であると考えられてきたが、全ての細胞が 10 日生存するのではなく、味蕾細胞には誕生後 4 日目頃までに消失してしまう短い寿命の細胞と、一ヶ月近く生き残る長寿命の細胞が存在することが分かった。

2. 味蕾特異的に発現する分子の探索

味覚受容細胞の分化段階を解析する為に、味蕾特異的に発現する分化関連因子の発現解析を行った。味蕾細胞は、感覚細胞であり、一般上皮細胞にはない神経細胞様の性質を持つことと、味覚の伝達はカルシウムを介したシグナル伝達であることの、二つの特徴がある。そこで、神経系細胞に発現する分化関連因子である bHLH 転写因子群と、カルシウムシグナリング関連転写因子である MEF2 ファミリー及び NFAT ファミリーの味蕾における発現解析を行った。その結果、bHLH 転写因子群の強い発現は、既知の Mash1 以外には観察されなかった。したがって味蕾では、嗅神経細胞等のように数種類の bHLH 転写因子が順次発現して分化が進行する系とは異なり、Mash1 を含む单一あるいは少数の bHLH 転写因子が一部の味蕾細胞の分化に関与していることが示唆された。また、カルシウムシグナリング関連の転写因子については、MEF2D と NFATc4 が味蕾細胞の一部で特異的に発現していることがわかった。次に、これらの因子と味覚受容細胞のマーカーである PLC β 2 との二重免疫染色を行った結果、MEF2D と PLC β 2 の発現はほぼ一致し、また NFATc4 は PLC β 2 が発現している細胞の約 60%で発現していることが分かった。したがって、MEF2D と NFATc4 は味覚受容細胞の分化最終段階や成熟した段階で転写因子として機能している

ことが示唆された。

3. 味蕾特異的に発現する因子の発現時期について

Mash1, PLC β 2, 及び MEF2D, NFATc4 について、それぞれが発現する細胞の細胞齢を解析した。具体的には、BrdU 投与後、様々な時間が経過したラットの組織切片を用いて、Mash1, PLC β 2 については mRNA の発現を *in situ* hybridization により検出し、PLC β 2, MEF2D, NFATc4 についてはタンパク質の発現を免疫染色により検出した。次に同じ切片に対し、抗 BrdU 抗体を用いて BrdU の存在を検出することによって、各細胞齢で発現する因子を比較定量した。その結果、Mash1 mRNA は細胞分裂後 5~6 日目に発現のピークがあり、その後減少した。しかしこく少数の細胞は、誕生から 26 日後の細胞においても発現していることが分かった。つまり、短寿命の細胞が失われた後の長寿命細胞の一部に Mash1 は発現し、分裂後 5~6 日目にピークを迎える何らかの分化現象に関わっていることが示唆された。PLC β 2 mRNA は、6 日目に一過的な発現の増加が見られたが、その後一旦やや減少し、10 日目以降に再び発現が上昇して 12 日目にピークが見られ、その後 20 日以降まで発現が観察された。これまで味蕾細胞は 10 日の寿命と言われてきたが、この発現解析から、味覚受容細胞は 10 日目以降の時期に主として機能していることが分かった。また、PLC β 2 タンパク質の解析では、誕生後 20 日目の味蕾細胞において PLC β 2 タンパク質発現細胞の頻度が最も高くなっていたことから、味覚受容細胞は他のタイプの味蕾細胞よりも長寿命であることが示唆された。MEF2D タンパク質の経時的発現パターンは、PLC β 2 タンパク質の発現パターンとほぼ同様だった。また、NFATc4 タンパク質は PLC β 2 タンパク質よりも発現頻度が低いものの同様のパターンを示した。以上のことから、MEF2D と NFATc4 は、味覚受容細胞に発現し機能している遺伝子の転写制御に関係していることが示唆された。

4. MEF2D による PLC β 2 の転写活性制御について

以上のように、本研究で味覚受容細胞特異的な発現を同定した転写因子 MEF2D は、骨格筋や脳の海馬などの系で既に知られているように、カルシウムシグナリングとの関連が考えられた。ここでは、MEF2D が PLC β 2 の発現に直接関わっている可能性を考え、弱い PLC β 2 の発現が見られるヒト急性リンパ性白血病由来 T 細胞系 Jurkat 細胞において、PLC β 2 エンハンサープロモーター領域を用いたレポーターアッセイを行った。トランスジェニックマウスの解析から、味覚受容細胞特異的発現を担う PLC β 2 のエンハンサー領域が開始コドンから 5' 上流域約 2.9 kbp に存在することが示されているため、ラットの相同領域(2.9 kbp)をルシフェラーゼコード配列の上流に挿入したレポータープラスミドを作製した。さらに、この 2.9 kbp 領域を 4 つに分割して組み合わせた 6 種類のレポータープラスミドも作製して解析した。その結果、開始コドンから上流 1.8 kbp 付近までに転写活性化領域が、さらにその上流(1.8~2.9 kbp 領域)に転写抑制領域があることが分かった。次に、MEF2D の発現プラスミドをレポータープラスミドと同時に導入したアッセイを行った結果、上記のいずれのレポータープラスミドに関しても MEF2D の発現による転写活性の変化は見ら

れなかった。しかし、カルシウムイオノフォアを用いて細胞内カルシウム濃度を上げると、MEF2D の発現によってレポーター遺伝子の転写活性がさらに上昇した。以上から、MEF2D は細胞内カルシウム濃度上昇を受けて PLC β 2 遺伝子の転写を活性化していることが示唆された。

以上のように、本研究によって、味蕾細胞の寿命は均一ではなく、細胞分裂後 4 日以内に消失する短寿命細胞と、一ヶ月近く生きる長寿命細胞に大別することができる事が分かった。長寿命の細胞には、分裂後 5~6 日目に Mash1 が発現するような分化過程を示す細胞や、主に 10 日目以降に機能している PLC β 2 を発現する味覚受容細胞が含まれていた。また、味覚受容細胞はその他の細胞群よりも相対的に長寿命であることが示唆された。さらに、MEF2D は PLC β 2 を発現する味覚受容細胞において PLC β 2 と同じ経時変化で発現し、味覚受容細胞の分化最終段階や成熟後の機能発現段階において、PLC β 2 などの発現に関与していることが示された。